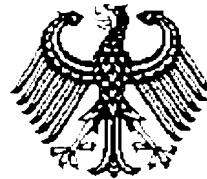


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



J1017 U.S. PTO  
10/058945  
01/30/02

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 03 873.9  
Anmeldetag: 30. Januar 2001  
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE  
Bezeichnung: Neue für das otsA-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen  
IPC: C 07 H, C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. November 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**Neue für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**

Gegenstand der Erfindung sind für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das otsA-Gen abgeschwächt wird.

**Stand der Technik**

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die

Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-15 Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das otsA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b),
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthase aufweist.
- Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:
- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb der Degeneriertheit des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i), die die Aktivität des Proteins/Polypeptids nicht verändern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind schließlich Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1 und 601
- b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der

Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 602 und 1423

- c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den Positionen 1424 und 1964

Weitere Gegenstände sind:

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das otsA-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die

für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des otsA-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau 5 in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren 10 Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt 15 mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40 oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 20 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

25 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein 30 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90% und ganz

besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder einem daraus hergestellten Fragmentes.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine,  
5 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid  
gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der  
biologischen Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthase  
10 und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%,  
bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu  
wenigstens 86% bis 90% und ganz besonders bevorzugt zu  
wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit  
dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte  
15 Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur  
fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus  
der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-  
Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-  
20 Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin,  
L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von  
coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits  
Aminosäuren produzieren und in denen die für das otsA-Gen  
kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere  
25 ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem  
Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der  
intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw.  
Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die  
30 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise  
einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel  
verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein  
mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das

entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Gluccse, Saccharose, 5 Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu 10 nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

15           *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
          *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
          *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
          *Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
          *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
20           *Brevibacterium flavum* ATCC14067  
          *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
          *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L- 25 Lysin produzierenden Stämme

*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709  
          *Brevibacterium flavum* FERM-P 1708  
          *Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712  
          *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463  
30           *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464  
          *Corynebacterium glutamicum* DM58-1  
          *Corynebacterium glutamicum* DG52-5

Corynebacterium glutamicum DSM5715 und  
Corynebacterium glutamicum DSM12866.

Das neue, für das Enzym Trehalose-6-Phosphat-Synthase (EC Nr. 2.4.1.15) kodierende otsA-Gen von C. glutamicum wurde 5 isoliert.

Zur Isolierung des otsA-Gens oder auch anderer Gene von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten 10 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor 15 Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, 20 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHC79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life 30 Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$ mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National

Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ-Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete 5 Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

- Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten 10 Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.
- 15 Die neue für das otsA-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins 20 abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des otsA-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.
- 25 Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der 30 Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins 35 führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen

werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

- 5 Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten  
10 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.  
Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfahrung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1  
15 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfahrung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfahrung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben  
20 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
25 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit  
30 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschrifte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die  
35 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ

niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x  
5 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C  
eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit  
Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%  
Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride  
sind weniger stabil und werden durch Waschen unter  
10 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise  
durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und  
gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's  
Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,  
Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine  
15 Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist  
gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x  
SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der  
Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von  
50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert  
20 werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens  
80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens 96% bis 99%  
Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Es  
ist ebenfalls möglich Polynukleotidfragmente zu isolieren,  
die eine vollständige Identität zur Sequenz der  
25 eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur  
Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt  
erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche  
Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No.  
1603558).
- 30 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe  
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann  
unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide  
synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK,  
1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer  
35 Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des otsA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die  
5 Expression des otsA-Gens oder die katalytischen/regulatorischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete  
10 Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und  
15 Terminationen. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191  
20 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers  
25 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind  
30 aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydrolase aus  
35 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen

Regulation und Struktur des Enzyms", Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jülich-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise

E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"- Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'- Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation

in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

10 In das otsA-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des otsA-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, 15 der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang 20 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene oder Allele erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein 25 Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Abschwächung des otsA-Gens gleichzeitig eines oder mehrere 30 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydripicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- 5 • das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 15 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No. P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- 20 • das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin 25 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des otsA-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxE (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113),
- das für die Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen fda (Accession No. X17313; von der Osten et al., Molecular Microbiology 3 (11), 1625-1637 (1989)),

- 10 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A-0131171),
- das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen thrB (Peoples, O.W., et al., Molecular Microbiology 2 (1988) : 63 - 72) und
- 15 • das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen pand (EP-A-1006192) und

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 20 Die Abschwächung der Homoserin-Dehydrogenase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Valin gegen L-Alanin, L-Glycin oder L-Leucin an Position 59 des Enzymproteins, durch den Austausch von L-Valin gegen L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin an Position 104 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Asparagin gegen L-Threonin oder L-Serin an Position 118 des Enzymproteins erreicht werden.

Die Abschwächung der Homoserin-Kinase kann unter anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch den Austausch von L-Alanin gegen L-Valin, L-Glycin oder L-

- 30

Leucin an Position 133 des Enzymproteins und/oder durch den Austausch von L-Prolin gegen L-Threonin, L-Isoleucin oder L-Serin an Position 138 des Enzymproteins erreicht werden.

Die Abschwächung der Aspartat-Decarboxylase kann unter 5 anderem auch durch Aminosäureaustausche, wie beispielsweise durch die Austausche L-Alanin gegen L-Glycin, L-Valin oder L-Isoleucin an Position 36 des Enzymproteins erreicht werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren 10 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des otsA-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

15 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) 20 zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 25 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen 30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 10 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und 15 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

- 20 Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- 30 Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können 35 Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester

eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat.

10 Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 15 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

25 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

30 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wird wie bei  
5 Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben  
isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham  
Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung  
Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-  
Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche  
10 Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,  
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)  
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1  
(Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of  
Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma  
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wird mit dem  
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
20 dephosphoryliert.

Anschließend wird die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wird mit der  
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
behandelt. Das Ligationsgemisch wird anschließend mit Hilfe  
des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla,  
30 USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract,  
Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.  
1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) werden die Zellen in  
10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der

Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank werden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 mg/l Ampicillin ausplattiert werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden rekombinante Einzelklone selektiert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des Gens otsA

10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-15 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Isolierung 20 der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung 25 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wird mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wird wie von Sambrook et al. 30 (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wird. Dieses Ligationsgemisch wird anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990,

Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

- 5 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgt mit  
aem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,  
Deutschland). Die Sequenzierung erfolgt nach der Dideoxy-  
Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings  
of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-  
10 5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990,  
Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wird der "RR dRhodamin  
Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems  
(Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.  
Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der  
15 Sequenzierreaktion erfolgt in einem "Rotiphorese NF  
Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1,  
Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"  
Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt,  
Deutschland).
- 20 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten werden anschließend unter  
Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids  
Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die  
Einzelsequenzen der pZerol-Derivate werden zu einem  
zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte  
25 Kodierbereichsanalyse wird mit dem Programm XNIP (Staden,  
1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1  
dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergibt ein  
offenes Leseraster von 1485 bp, welches als otsA-Gen  
30 bezeichnet wird. Das otsA-Gen kodiert für ein Polypeptid  
von 485 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das otsA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 010037 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3010

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (884)..(2338)

&lt;223&gt; otsA-Gen

25

&lt;400&gt; 1

attgcggggc ttactgcgct gatgggttct gcgttttatt acctcttcgt tggtttattta 60

ggcccccgtct ctgccgcgtgc gattgctgca acagcagttg gtttcactgg tgggttgctt 120

30

gccccgtcgat tcttgattcc accgttgatt gtggcgattg ccggcatcac accaatgctt 180

ccaggtctag caatttaccg cgaaatgtac gccaccctga atgatcaaac actcatgggt 240

35

ttcaccaaca ttgcgggtgc tttagccact gtttcatcac ttgcgcgtgg cgtgggtttt 300

ggtgagtgga ttgcccgcag gctacgtcgt ccaccacgct tcaaccata cggcgtcattt 360

40

accaaggcga atgagttctc cttccaggag gaagctgagc agaatcagcg cggcagaga 420

aaacgtccaa agactaatca gagattcggt aataaaaggt aaaaatcaac ctgcttaggc 480

gtctttcgct taaatagcgt agaatatcgg gtcgatcgct tttaaacact caggaggatc 540

45

cttgccggcc aaaatcacgg acactcggtcc cacccagaa tcccttcacg ctgttgaaga 600

ggaaaccgca gccgggtgcc gcaggattgt tgccacctat tctaaggact tcttcgacgg 660

cgtcactttg atgtgcgtgc tcggcggtga acctcagggc ctgcgttaca ccaaggtcgc 720

50

ttctgaacac gaggaagctc agccaaagaa ggctacaaag cggactcgta aggcaccagc 780

taagaaggct gctgctaaga aaacgaccaa gaagaccact aagaaaaacta ctaaaaagac 840

55

caccgcaaag aagaccacaa agaagtctt agccggatct tat atg gat gat tcc 895

Met Asp Asp Ser

	aat agc ttt gta gtt gtt gct aac cgt ctg cca gtg gat atg act gtc	943
	Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Val Asp Met Thr Val	
5	5 10 15 20	
5	cac cca gat ggt agc tat agc atc tcc ccc agc ccc ggt ggc ctt gtc	991
	His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser Pro Gly Gly Leu Val	
	25 30 35	
10	acg ggg ctt tcc ccc gtt ctg gaa caa cat cgt gga tgt tgg gtc gga	1039
	Tyr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg Gly Cys Trp Val Gly	
	40 45 50	
15	tgg cct gga act gta gat gtt gca ccc gaa cca ttt cga aca gat acg	1087
	Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro Phe Arg Thr Asp Thr	
	55 60 65	
20	ggt gtt ttg ctg cac cct gtt gtc ctc act gca agt gac tat gaa ggc	1135
	Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala Ser Asp Tyr Glu Gly	
	70 75 80	
25	ttc tac gag ggc ttt tca aac gca acg ctg tgg cct ctt ttc cac gat	1183
	Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp Pro Leu Phe His Asp	
	85 90 95 100	
30	ctg att gtt act ccg gtg tac aac acc gat tgg tgg cat gcg ttt cgg	1231
	Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp Trp His Ala Phe Arg	
	105 110 115	
35	gag gta aac ctc aag ttc gct gaa gcc gtg agc caa gtg gcg gca cac	1279
	Glu Val Asn Leu Lys Phe Ala Glu Ala Val Ser Gln Val Ala Ala His	
	120 125 130	
40	ggt gcc act gtg tgg gtg cag gac tat cag ctg ttg ctg gtt cct ggc	1327
	Gly Ala Thr Val Trp Val Gln Asp Tyr Gln Leu Leu Leu Val Pro Gly	
	135 140 145	
45	att ttg cgc cag atg cgc cct gat ttg aag atc ggt ttc ttc ctc cac	1375
	Ile Leu Arg Gln Met Arg Pro Asp Leu Lys Ile Gly Phe Phe Leu His	
	150 155 160	
50	att ccc ttc cct tcc cct gat ctg ttc cgt cag ctg ccg tgg cgt gaa	1423
	Ile Pro Phe Pro Ser Pro Asp Leu Phe Arg Gln Leu Pro Trp Arg Glu	
	165 170 175 180	
55	gag att gtt cga ggc atg ctg ggc gca gat ttg gtg gga ttc cat ttg	1471
	Glu Ile Val Arg Gly Met Leu Gly Ala Asp Leu Val Gly Phe His Leu	
	185 190 195	
60	gtt caa aac gca gaa aac ttc ctt gcg tta acc cag cag gtt gcc ggc	1519
	Val Gln Asn Ala Glu Asn Phe Leu Ala Leu Thr Gln Gln Val Ala Gly	
	200 205 210	
65	act gcc ggg tct cat gtg ggt cag ccg gac acc ttg cag gtc agt ggt	1567
	Thr Ala Gly Ser His Val Gly Gln Pro Asp Thr Leu Gln Val Ser Gly	
	215 220 225	
70	gaa gca ttg gtg cgt gag att ggc gct cat gtt gaa acc gct gac gga	1615
	Glu Ala Leu Val Arg Glu Ile Gly Ala His Val Glu Thr Ala Asp Gly	
	230 235 240	

	agg cga gtt agc gtc ggg gcg ttc ccg atc tcg att gat gtt gaa atg Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser Ile Asp Val Glu Met 245	250	255	260	1663
5	ttt ggg gag gcg tcg aaa agc gcc gtt ctt gat ctt tta aaa acg ctc Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp Leu Leu Lys Thr Leu 265	270	275		1711
10	gac gag cog gaa acc gta ttc ctg ggc gtt gac cga ctg gac tac acc Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp Arg Leu Asp Tyr Thr 280	285	290		1759
15	aag ggc att ttg cag cgc ctg ctt gcg ttt gag gaa ctg ctg gaa tcc Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu Glu Leu Leu Glu Ser 295	300	305		1807
20	ggc gcg ttg gag gcc gac aaa gct gtg ttg ctg cag gtc gcg acg cct Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu Gln Val Ala Thr Pro 310	315	320		1855
25	tcg cgt gag cgc att gat cac tat cgt gtg tcg cgt tcg cag gtc gag Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser Arg Ser Gln Val Glu 325	330	335	340	1903
30	gaa gcc gtc ggc cgt atc aat ggt cgt ttc ggt cgc atg ggg cgt ccc Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly Arg Met Gly Arg Pro 345	350	355		1951
35	gtg gtg cat tat cta cac agg tca ttg agc aaa aat gat ctc cag gtg Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys Asn Asp Leu Gln Val 360	365	370		1999
40	ctg tat acc gca gcc gat gtc atg ctg gtt acg cct ttt aaa gac ggt Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr Pro Phe Lys Asp Gly 375	380	385		2047
45	atg aac ttg gtg gct aaa gaa ttc gtg gcc aac cac cgc gac ggc act Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn His Arg Asp Gly Thr 390	395	400		2095
50	ggt gct ttg gtg ctg tcc gaa ttt gcc ggc gcg gcc act gag ctg acc Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala Ala Thr Glu Leu Thr 405	410	415	420	2143
55	ggt gcg tat tta tgc aac cca ttt gat gtg gaa tcc atc aaa cgg caa Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu Ser Ile Lys Arg Gln 425	430	435		2191
	atg gtg gca gct gtc cat gat ttg aag cac aat ccg gaa tct gcg gca Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro Glu Ser Ala Ala 440	445	450		2239
	acg cga atg aaa acg aac agc gag cag gtc tat acc cac gac gtc aac Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr His Asp Val Asn 455	460	465		2287



	His Ala Phe Arg Glu Val Asn Leu Lys Phe Ala Glu Ala Val Ser Gin			
	115	120	125	
5	Val Ala Ala His Gly Ala Thr Val Trp Val Gln Asp Tyr Gln Leu Leu			
	130	135	140	
	Leu Val Pro Gly Ile Leu Arg Gln Met Arg Pro Asp Leu Lys Ile Gly			
	145	150	155	160
10	Phe Phe Leu His Ile Pro Phe Pro Ser Pro Asp Leu Phe Arg Gln Leu			
	165	170	175	
	Pro Trp Arg Glu Glu Ile Val Arg Gly Met Leu Gly Ala Asp Leu Val			
	180	185	190	
15	Gly Phe His Leu Val Gln Asn Ala Glu Asn Phe Leu Ala Leu Thr Gln			
	195	200	205	
20	Gln Val Ala Gly Thr Ala Gly Ser His Val Gly Gln Pro Asp Thr Leu			
	210	215	220	
	Gln Val Ser Gly Glu Ala Leu Val Arg Glu Ile Gly Ala His Val Glu			
	225	230	235	240
25	Thr Ala Asp Gly Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser Ile			
	245	250	255	
	Asp Val Glu Met Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp Leu			
	260	265	270	
30	Leu Lys Thr Leu Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp Arg			
	275	280	285	
	Leu Asp Tyr Thr Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu Glu			
35	290	295	300	
	Leu Leu Glu Ser Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu Gln			
	305	310	315	320
40	Val Ala Thr Pro Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser Arg			
	325	330	335	
	Ser Gln Val Glu Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly Arg			
	340	345	350	
45	Met Gly Arg Pro Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys Asn			
	355	360	365	
	Asp Leu Gln Val Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr Pro			
50	370	375	380	
	Phe Lys Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn His			
	385	390	395	400
55	Arg Asp Gly Thr Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala Ala			
	405	410	415	
	Thr Glu Leu Thr Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu Ser			
	420	425	430	

Ile Lys Arg Gln Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro  
435 440 445

5 Glu Ser Ala Ala Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr  
450 455 460

His Asp Val Asn Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala Gln  
465 470 475 480

10 Ser Gly Glu Asn Ser  
485

15

010037 BT

30

**Patentansprüche**

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das otsA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - b) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
  - c) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,
- 15 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Trehalose-6-Phosphat-Synthase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
- 20 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - 25 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
  - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

010037 BT

31

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
(i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

5 6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung  
unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC  
durchgeführt wird.

7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein  
10 Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.

8. Coryneform Bakterien, in denen das otsA-Gen  
abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.

9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
15 Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte  
durchführt:

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
20 zumindest das otsA-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere  
ausschaltet;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den  
Zellen der Bakterien, und

25 c) Isolieren der L-Aminosäure.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des  
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure  
30 verstärkt.

010037 BT

32

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.  
5
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das otsA-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.  
10
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die regulatorischen (bzw. katalytischen) Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das Polynukleotid otsA kodiert.  
15
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe  
20
- 14.1 das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
- 14.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 25 14.3 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 14.4 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 14.5 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,  
30
- 14.6 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,

010037 BT

33

- 14.7 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 14.8 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo,
- 5 14.9 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 14.10 das für den Lysin-Export kodierende Gen lySE,
- 14.11 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal
- 10 verstärkt bzw. überexprimiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
- 15.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi,
- 20 15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2,
- 15.5 das für die Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen fda,
- 15.6 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 25 15.7 das für die Homoserin-Kinase kodierende Gen thrB,

010037 BT

34

- 15.8 das für die Aspartat-Decarboxylase kodierende Gen *panD* abschwächt.
16. Coryneformen Bakterien, die einen Vektor enthalten, der 5 Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz, trägt.
17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt. 10
18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase 15 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *otsA*-Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.
- 20 19. Verfahren gemäß Anspruch 18, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro arrays oder DNA-chips einsetzt.